



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C08B 37/00, C12P 19/04, A61K</b> <b>31/715 // (C12P 19/04, C12R 1:42)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO96/23002</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>1996年8月1日(01.08.96)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> <b>PCT/JP96/00135</b> <b>(22) 国際出願日</b> <b>1996年1月25日(25.01.96)</b>  <b>(30) 優先権データ</b> <b>特願平/712126</b> <b>1995年1月27日(27.01.95)</b> <b>JP</b>  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> <b>大鵬薬品工業株式会社</b> <b>(TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]</b> <b>〒101 東京都千代田区神田錦町一丁目27番地 Tokyo, (JP)</b> <b>(72) 発明者：および</b> <b>(75) 発明者／出願人 (米国についてののみ)</b> <b>水野傳一(MIZUNO, Den-ichi)[JP/JP]</b> <b>〒247 神奈川県鎌倉市岡本一丁目21番20号 Kanagawa, (JP)</b> <b>柚原一郎(SOMA, Gen-ichiro)[JP/JP]</b> <b>〒158 東京都世田谷区東玉川一丁目10番21号 Tokyo, (JP)</b> <b>西沢孝志(NISHIZAWA, Takashi)[JP/JP]</b> <b>〒114 東京都北区西ヶ原二丁目35番12号 Tokyo, (JP)</b>		<b>(74) 代理人</b> <b>弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.)</b> <b>〒107 東京都港区赤坂一丁目12番32号</b> <b>アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)</b>  <b>(31) 指定国</b> <b>US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT,</b> <b>LU, MC, NL, PT, SE).</b>  <b>添付公開書類</b> <b>国際調査報告書</b>
<b>(54) Title : LOW-MOLECULAR-WEIGHT LIPOPOLYSACCHARIDE</b>  <b>(54) 発明の名称 低分子量リボポリサッカライド</b>  <b>(57) Abstract</b>  <p>A nobel low-molecular-weight lipopolysaccharide having such a high safety as to permit the use thereof as a medicine and a high biological activity. It is obtained from microbial cells and has physicochemical and biological properties such that (a) it has a molecular weight of <math>5,000 \pm 2,000</math> as determined by SDS-PAGE using protein markers and is substantially free from other stained zones, (b) it has a hexosamine content of 1 to 3 per molecular weight of 5,000 as determined by the Elson-Morgan method, (c) it has a 2-keto-3-deoxyoctonate content of 1 to 3 per molecular weight of 5,000 as determined by the diphenylamine method, and (d) it has a limulus activity of at least 10 EUng.</p>		

# (57) 要約

この発明は、医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い新規な低分子量LPSを提供することを目的とするものであり、その低分子量LPSは、微生物菌体から得られ、a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が $5,000 \pm 2,000$ であり、他に染色帯を実質的に認めないこと、b) エルソン-モルガン法により測定したヘキサミン含量が1~3個/分子量5,000であること、c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量5,000であること、d) リムラス活性が、少なくとも10 EU/ngであること、の理化学的および生物学的性質を有するものである。

## 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	マラウイ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KZ	大韓民国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェッコ共和国		カザフスタン			VN	ヴェトナム

## 明 細 書

## 低分子量リポポリサッカライド

## 技術分野

この発明は、特定の理化学的性質および生物学的性質を有し、安全性が極めて  
5 高く（毒性が低い）、かつ生物活性の高い新規な低分子量リポポリサッカライド  
に関するものである。

## 背景技術

リポポリサッカライド(lipopolysaccharide。以下、LPSと記載することが  
10 ある)は、大腸菌、サルモネラ菌、百日咳菌等のグラム陰性細菌細胞壁のペプチ  
ドグリカンを囲む外膜に存在している脂質および糖からなる複合化合物であり、  
O抗原およびエンドトキシンの活性成分として知られている[ジェー・エム・ギ  
ューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Guysen and R. Hakenbeck) 編、  
「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochem  
15 istry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、  
第18ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。LPSの基本構造は、  
特異な脂質を有するリピドA、それに共有結合したRコアと呼ばれるオリゴ糖、  
さらにO特異多糖の3成分よりなっている(「日経バイオテクノロジー最新用語  
辞典」、第431ページ、日経マグローヒル社、1985年)。

20 リピドAの基本構造は多くの菌種に共通であり、基本骨格は $\beta$ -1, 6結合の  
グルコサミニル・グルコサミンからなりC-1位およびC-4'位にそれぞれリ  
ン酸を結合している場合が多い。各アミノ基は3-ヒドロキシ脂肪酸を、水酸基  
は数種の飽和脂肪酸またはヒドロキシ脂肪酸を結合し、独特の糖脂質を形成して  
いるが、脂肪酸の種類は菌種によって多少異なっている。少数例であるが基本骨  
25 格が全く異なり、2, 3-ジアミノ-2, 3-ジデオキシ-D-グルコースのみ  
からなる例も報告されている(野間惟道編、「医科学大辞典第49巻」、第82  
ページ、講談社、1984年)。

Rコアの構造はサルモネラ属のようにそれに属する大部分の菌種に共通である  
場合と、大腸菌のように部分的に異なる数種の 造が知られている場合とがある

- [ジェー・エム・グューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Ghuyssen and R. Hackenbeck)編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第283ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。
- 5 一般にヘプトースと2-ケト-3-デオキシオクトネート(以下、KDOと記載する)が多くのRコアに共通の構成成分であり、KDOを介してリピドAと結合しているが、菌種によっていずれか一方または双方が欠如しているLPSの存在も知られている [ジェー・エム・グューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Ghuyssen and R. Hackenbeck)編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第294～295ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。
- 10

- O特異多糖の構造は、構成成分の中で最も多様であり、菌種に特異的であって、いわゆるO抗原としての活性を示す。一般に数種の単糖からなるオリゴ糖の繰返し構造を特徴とするが、同一単糖からなるもの、または繰返し構造でないものも知られている。O特異多糖の生合成はRコアのそれとは異なる遺伝子の支配を受けており、接合または形質導入により異なる菌種のO特異多糖を置換することが可能であり、菌の毒力およびワクチンの研究等に応用されている [ジェー・エム・グューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Ghuyssen and R. Hackenbeck)編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第265～267ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。
- 15
- 20

- LPSは極めて多様な薬理作用を有しているが、例えば抗原およびLPSを同時に投与した場合、免疫反応が増強されることから、LPSは現在ワクチン効果を高める補助剤(アジュバント)の一種として重用されている(本間遜他編、「細菌内毒素」、第312ページ、講談社、1973年)。
- 25

従来、多種多様なLPSが報告されているが、一般にどのような方法で抽出したLPSであっても、 $10^6 \sim 10^7$ の極めて大きな分子量を有することが知られている(本間遜他編、「細菌内毒素」、第211ページ、講談社、1973年)

）。その後、比較的分子量の小さいLPSも報告され、小麦由来のSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) による分子量8,000 $\pm$ 1,000または5,000 $\pm$ 2,000、リン数1~4/分子量8,000、ヘキソサミン数6 $\pm$ 2/分子量8,000、脂肪酸数6 $\pm$ 2/分子量8,000、KDO数5 $\pm$ 1/分子量8,000のLPS (特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報)、クロレラ由来のSDS-PAGEによる分子量40,000~90,000、リン数4 $\pm$ 1/分子量1万、ヘキソサミン数7 $\pm$ 1/分子量1万、脂肪酸数6 $\pm$ 1/分子量1万、KDO数2 $\pm$ 1/分子量1万のLPS (特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報)、大腸菌由来のSDS-PAGEによる分子量30,000 $\pm$ 5,000、リン数12/分子量3万、ヘキソサミン数45 $\pm$ 6/分子量3万、脂肪酸数18/分子量3万、KDO数5 $\pm$ 1/分子量3万のLPS (特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報)、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,000 $\pm$ 1,000または9,000 $\pm$ 1,000、リン数5/分子量8,000、ヘキソサミン数16 $\pm$ 2/分子量8,000、脂肪酸数5/分子量8,000、KDO数2 $\pm$ 1/分子量8,000のLPS (特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報)、大腸菌由来のSDS-PAGEによる分子量40,000 $\pm$ 10,000または8,000 $\pm$ 4,000、リン数12/分子量3万、ヘキソサミン数45 $\pm$ 6/分子量3万、脂肪酸数18/分子量3万、KDO数5 $\pm$ 1/分子量3万のLPS (特開平6-40937号公報)、セラチア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000 $\pm$ 1,000、リン数2 $\pm$ 1/分子量5,000

0、ヘキソサミン数 $9 \pm 1$ ／分子量5,000、KDO数 $2 \pm 1$ ／分子量5,000のLPS（特開平6-40937号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報）、エンテロバクター属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,500 $\pm$ 2,500、リン数1~2／分子量5,000、ヘキソサミン数 $7 \pm 1$ ／分子量5,000、KDO数1~2／分子量5,000のLPS（特開平6-40937号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報）、パントエア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,500 $\pm$ 2,500、リン数 $2 \pm 1$ ／分子量5,000、ヘキソサミン数 $5 \pm 1$ ／分子量5,000、KDO数 $2 \pm 1$ ／分子量5,000のLPS（特開平6-40937号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報）、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,000 $\pm$ 1,000、リン数4／分子量6,000、ヘキソサミン数12／分子量6,000、KDO数 $2 \pm 1$ ／分子量6,000のLPS（特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報）、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,000 $\pm$ 1,000または9,500 $\pm$ 1,500、リン数5／分子量8,000、ヘキソサミン数 $16 \pm 2$ ／分子量8,000、KDO数 $2 \pm 1$ ／分子量8,000のLPS（特開平4-187640号公報）、アエロモナス・ヒドロフィア種菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000 $\pm$ 1,500、リン数 $2 \pm 1$ ／分子量5,000、ヘキソサミン数 $9 \pm 1$ ／分子量5,000、KDO数 $0.8 \pm 0.5$ ／分子量5,000のLPS（特開平6-141849号公報）、パントエア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000、リン数2／分子量5,000、ヘキソサミン数2／分子量5,000、KDO数5／分子量5,000 [バイオセラピー(BIOTHERAPY)、第6巻、第3号、第357ページ、1992年] 等が報告されている。

前記のとおり分子量5,000前後のLPSは、既に報告されているが、これらのSDS-PAGEにおける主染色帯が、5,000または6,000であると同時に、分子量3万以上に相当する染色帯も存在していたのである。即ち、従

来の分子量 5, 0 0 0 前後の L P S は分子量 3 万以上の L P S との混合物であった。

L P S の用途についてはこの発明の発明者らにより、これまでに抗トキソプラズマ剤（特開平 4 - 4 9 2 4 5 号公報）、コレステロール低下剤（特開平 4 - 4 9 2 4 3 号公報）、抗ヘルペス剤（特開平 4 - 4 9 2 4 2 号公報）、抗リュウマチ剤（特開平 4 - 4 9 2 4 1 号公報）、抗糖尿病剤（特開平 4 - 4 9 2 4 4 号公報）、抗消化性潰瘍剤（特開平 4 - 4 9 2 4 0 号公報）、免疫機能活性化剤（特開平 4 - 9 9 4 8 1 号公報、特開平 6 - 1 4 1 8 4 9 号公報）、経口・経皮免疫機能促進剤（特開平 4 - 1 8 7 6 4 0 号公報）、鎮痛剤（特開平 6 - 4 0 9 3 7 号公報）、発育促進剤（特開平 5 - 1 5 5 7 7 8 号公報）、抗禁断症状剤（特開平 6 - 6 5 0 9 2 号公報）等が提案されている。

しかしながら、従来の L P S は、安全性の面から、臨床応用への問題点が指摘されてもいる（日本組織培養学会編、「細胞成長因子 p a r t II」、第 1 2 1 ページ、朝倉書店、1 9 8 7 年）。

一方、細菌の細胞壁から L P S を精製する方法については、従来フェノール水抽出法 [オー・ウエストファール(O. Westphal) 編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第 5 巻、第 8 3 ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1 9 6 5 年]、トリクロル酢酸抽出法 [エー・エム・スタブ(A.M. Staub)編、メソッズ・イン・イムノロジー・アンド・イムノケミストリー(Methods in Immunology and Immunochimistry)、第 1 巻、第 2 8 ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1 9 6 7 年]、E D T A 抽出法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第 2 4 3 号、第 6 3 8 4 ページ、1 9 6 8 年] 等が知られているが、このようにして得られた L P S は、デオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下で、更に分子量約 2 0, 0 0 0 程度のサブユニットに解離することが報告されている（本間遜他編、「細菌内毒素」、第 2 2 9 ページ、講談社、1 9 7 3 年）。一方、分子量 2 0, 0 0 0 以上の L P S を含まず、分子量 5, 0 0 0 程度の極めて低分子量の L P S のみを取得する方法については、従来報告されていなかった。例えば特開平 4 - 9 9 4 8 1 号公報には、

SDS-PAGEの図が示されているが、分子量6,000付近の染色帯に加えて、分子量30,000以上の染色帯が明らかに存在している。また特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報において分子量5,000または6,000の低分子量LPSが開示されているが、これらはいずれも熱フェノール法およびイオン交換において精製された標品であり、高分子量LPSを完全に排除する工程が施されておらず、高分子量LPSが混在していた。

前記の通り、従来報告されている低分子量のLPSは、高分子量LPSを含む混合物であって、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤成分として臨床的に用いるには、安全性の面からも、あるいは薬効性能の面からも必ずしも満足のいくものではなかった。

この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来のLPSに比して安全性が高く（すなわち、毒性が低く）、かつ生物活性の優れた新規なLPSを提供することを目的としている。

#### 発明の開示

この発明の発明者らは、前記のような課題を解決するため、鋭意研究をおこなった結果、従来報告されているLPSとは異なる新規な低分子量LPSを発見し、しかもこの新規な低分子量LPSが、従来のLPSに比べて極めて安全性が高く、かつ生物活性も従来のLPSに比して優れていることを見出し、この発明を完成した。

すなわち、この発明は、微生物菌体から得られ、次のa)～c)の理化学的性質

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000 $\pm$ 2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと
- b) エルソン-モルガン法により測定したヘキサミン含量が1～3個/分子量5,000であること
- c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1～3個/分子量5,000であること



を有する低分子量リボポリサッカライドを提供する。

さらにこの発明は、微生物菌体から得られ、次のa)～f)の理化学的および生物学的性質

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5, 000±2, 000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと
- b) エルソン-モルガン法により測定したヘキサミン含量が1～3個/分子量5, 000であること
- c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1～3個/分子量5, 000であること
- d) リムラス活性が、少なくとも10 EU/ngであること
- e) タンパク質含量が、1% (重量) 以下であること
- f) 核酸含量が、1% (重量) 以下であること

を有する低分子量リボポリサッカライドをも提供する。

- また、この発明においては、前記の微生物が、グラム陰性の微生物であること、  
さらにはそのグラム陰性微生物が、パントエア(Pantoea) 属に属する微生物またはサルモネラ(Salmonella)属に属する微生物であることを望ましい態様としても

いる。  
本発明低分子量LPSは、安全性が高く、かつ優れた生物活性を有しており、前述した抗トキソプラズマ剤、コレステロール低下剤、抗ヘルペス剤、抗リウマチ剤、抗糖尿病剤、抗消化性潰瘍剤、免疫賦活剤(免疫機能活性化剤)、鎮痛剤、発育促進剤、抗禁断症状剤等の他、創傷治療剤、痔疾用剤、抗腫瘍剤等の医薬として有効である。

従って、本発明は、本発明低分子量LPSと薬学的担体とを含有する医薬組成物を提供するものである。

- 更に、本発明低分子量LPSを有効成分とする医薬、特に免疫賦活剤、創傷治療剤を提供するものである。

又、この医薬品は動物用医薬品として使用することもできる。

本発明は、微生物菌体から抽出して得られた粗リボポリサッカライドを陰イオン交換クロマトグラフィーで処理し、次いでこの処理したものを界面活性剤の存

在下にゲル濾過することを特徴とする本発明低分子量LPS製造方法を提供する。

この場合、界面活性剤はデオキシコール酸であることが好ましい。

次にこの発明について詳述する。

なお、以下の説明において、百分率の表示は、特に断らない限り、重量による

5 値である。

この発明の低分子量LPSは、グラム陰性の微生物、例えば、パントエア属に  
属する微生物またはサルモネラ属に属する微生物等を、常法により培養し、培地  
から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法 [オー・  
ウエストファール(O. Westphal) 編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケ  
10 ミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、ア  
カデミック・プレス(Academic Press)、1965年] により抽出し、さらに、陰  
イオン交換樹脂により精製して製造できる。すなわち、微生物の菌体を蒸留水に  
懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪  
拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去  
15 し、限外濾過法により濃縮して粗LPS画分を採取し、この画分を常法の陰イオン  
交換クロマトグラフィー (例えば、モノQ-セファローズまたはQ-セファロ  
ースを使用する) により精製し、常法により脱塩する。

このようにして得られた精製LPSは特開平4-187640号公報、特開平  
4-49240号公報、特開平4-99481号公報および特開平5-1557  
20 78号公報に開示されている分子量5,000から6,000程度のLPSに相  
当するとされているが、このLPSは実際の精製は未完遂であって、前記の通り  
高分子量画分を含む混合物である。このことは、本発明において、初めて明らか  
になったことであり、従来においては精製された低分子量LPSは単品としては  
存在していなかったと考えられる。その理由の一つとして、後述する本発明低分  
25 子量LPSのヘキソサミン数が従来の未精製LPSのそれと大きく異なることが  
挙げられる。即ち、従来では高分子量LPSが低分子量LPSに混在していたた  
めヘキソサミン数が本発明よりも大きく算出されたものであると考えられる。

従って、このような高分子量LPSを含む未精製LPSを、例えばデオキシコ  
ール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下でゲル濾過し、低分子量LPSを含有

する画分のみを回収し、混在する高分子量LPSを除去することによって、高度に精製されたこの発明の新規な低分子量LPSを得ることができる。この界面活性剤存在下でのゲル濾過の工程は、特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5, 000から6, 000程度のLPSを更に高度に精製するためのものであり、この工程により混在する高分子量LPSが完全に排除されるのである。

以上の方法により製造されたこの発明の新規な低分子量LPSは、後記する試験例1に示すとおり、

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5, 000 $\pm$ 2, 000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと
- b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1~3個/分子量5, 000であること
- c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量5, 000であること
- d) リムラス活性が、少なくとも10 EU/ngであること
- e) タンパク質含量が、1%以下であること
- f) 核酸含量が、1%以下であること

という理化学的および生物学的性質を有し、かつ少なくとも98%の純度を有している。しかしながら、使用目的によっては、精製の程度を低く（例えば、90%）にすることもできる。また、b) およびc) 項における「個/分子量5, 000」は、分子量5, 000の低分子量LPS分子1個当たりのヘキソサミン数またはKDO数を指す。そして、低分子量LPSの分子量が5, 000以外の場合におけるヘキソサミン数、KDO数は、分子量5, 000のものに比例するものとして換算することができる。また、低分子量LPSの分子量が5, 000以外の場合におけるヘキソサミン数、KDO数が既知の場合も、分子量5, 000における該各々の個数は、LPSの分子量に比例するものとして各々の個数を算出することができる。

本発明の低分子量LPSの免疫賦活能は、後記する試験例4に示す通り、マクロファージ活性を通じての内因性TNFの産生効果により確認し、免疫賦活作用

があることが判明した。

本発明の低分子量LPSは、各化合物ごとに使用できることはもちろん、その意図される用途において悪影響を与えない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、或いは更に他の医薬品と組み合わせ使用することもできる。

- 5 本発明の低分子量LPSは、適当な薬学的担体を用いて通常の方法に従い、医薬組成物とすることができる。担体としては、通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤、界面活性剤等を使用することができる。

- 10 本発明医薬又は医薬組成物を使用する際の投与単位形態は特に限定されず、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には注射剤、坐剤、外用剤（軟膏剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤等）、エアゾール剤等の非経口剤、錠剤、被覆錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤、液剤（懸濁剤、乳剤等）の経口剤が挙げられる。特に皮膚にはマクロファージが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

- 15 上記各組成物は、この分野で通常知られた製剤化方法により製剤化される。

- 注射剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等の希釈剤、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等のpH調整剤及び緩衝剤、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコール酸、チオ乳酸等の安定化剤などが使用できる。尚、この場合、等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖或いはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、無痛化剤、局所麻酔剤等を添加してもよい。これらの担体を添加して、常法により皮下、筋肉内、静脈
- 20 内用注射剤を製造することができる。

坐剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、ラノリン、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド、ウィテップゾール（登録商標：ダイナマイトノーベル社）等に適当な吸収促進剤を添加して使用できる。

軟膏剤、例えばペースト、クリーム及びゲルの形態に調製する際には、通常使用される基剤、安定剤、湿潤剤、保存剤等が必要に応じて配合され、常法により混合、製剤化される。基剤として例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト等を使用  
5 できる。保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が使用できる。

貼付剤を製造する場合には、通常の支持体に上記軟膏、クリーム、ゲル、ペースト等を常法により塗布すればよい。支持体としては、綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布や軟膏塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルム  
10 或いは発泡体シートが適当である。

錠剤、散剤、顆粒剤等の経口用固形製剤の形態に変形するに際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、メチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等の賦形剤、単シロップ、ブドウ糖液、デ  
15 ンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、水、エタノール、リン酸カリウム等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナ  
20 トリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用  
25 できる。更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

カプセル剤は上記で例示した各種の担体と混合し、硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。

- 5 液体製剤は水性又は油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤であってもよく、これらは通常の添加剤を用いて常法に従い、調製される。

上記製剤中に含有されるべき本発明化合物の量は、剤型、投与経路、投与計画等により異なり一概には言えず、広い範囲から適宜選択されるが、通常、製剤中に1～70重量%程度とするのがよい。

- 10 上記製剤の投与方法は特に限定されず、製剤の形態、患者等の投与対象の年齢、性別その他の条件、症状の程度等に応じて、経腸投与、経口投与、直腸投与、口腔内投与、経皮投与等の投与方法が適宜決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤の場合には経口投与され、坐剤の場合には直腸内投与される。注射剤の場合には単独で又はブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて単独で動脈内、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。軟膏剤は、皮膚、口腔内粘膜等に塗布される。

- 本発明の低分子量LPSの投与量、投与間隔は、当然、担当医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人(60kg)で、経口投与で $1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ 、静脈投与で $10\text{ng}\sim 10\text{mg}$ 、経皮投与で $100\text{ng}\sim 1\text{mg}$ が1日当たりの投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。これら製剤は1日に1回又は2～4回程度に分けて投与することができる。

次に試験例を示し、この発明の低分子量LPSについてさらに詳しく説明する。

#### 試験例1

この試験は、この発明の低分子量LPSの理化学的および生物学的性質を調べるために行った。

## 1) 試料の調製

参考例1と同一の方法により高分子量LPS含有の精製LPS（以下、単に「LPS」ともいう）を調製し、実施例1と同一の方法により本発明の低分子量LPSを、それぞれ調製した。

## 5 2) 試験方法

## ①分子量の測定

低分子量LPSおよびLPSを各々蒸留水に溶解して2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その10μgを1.5ml容プラスチックチューブに秤取した。これとは別に、180μlの10% (w/v) SDS、45μlの5%β-メルカプトエタノール、90μlのCBB色素溶液、112.5μlの0.5Mトリス塩酸 (pH 6.8) および22.5μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10μlを、前記各試料溶液に添加して十分混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸し、その後直ちに氷水中に浸して急冷した。

10mlの10% (w/v) SDS、17.9gのトリシンおよび3.03gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をスラブゲル電気泳動槽（マリソル社製）に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50Vに1時間、次いで、150Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を継続した。泳動終了後に、銀染色キット161-0443（バイオラッド社製）により室温で銀染色を行い、挙動を確認した。

## ②ヘキソサミン含有量の定量

ヘキソサミン含有量を、エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法（日本生化学会編、「生化学実験講座」、第4巻、第377～379ページ、第1版、東京化学同人出版、1976年）により次のとおり定量した。LPSを蒸留水に溶解して25 2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その100μlをスクリーキャップ付きスピッツ（イワキガラス社製）に秤取し、これに100μlの8N HClを添加して110℃で16時間加熱し、のち4N NaOHを約200μl添加してpHを7に調整した。その100μlを秤取し、別のスクリーキャップ付きスピッツに入れ、200μlの試薬Aを加え、105℃で1.5時間加熱し、流水

で冷却した。次いで、その $100\mu\text{l}$ を分取し、 $670\mu\text{l}$ の $96\%$ エタノールを加え、更に $67\mu\text{l}$ の試薬Bを加え、室温で1時間放置し、 $535\text{nm}$ における吸光度を測定した。検量線作成用標準試料としては、 $0\sim 800\mu\text{g}/\text{ml}$ のN-アセチルグルコサミン（和光純薬社製）を用いた。

- 5 試薬A： $75\mu\text{l}$ のアセチルアセトンと $2.5\text{ml}$ の $1.25\text{N}$ 炭酸ナトリウムとの混合液。

試薬B： $1.6\text{g}$ のp-ジメチルベンズアルデヒド、 $30\text{ml}$ の濃塩酸および $30\text{ml}$ の $96\%$ エタノールの混合液。

### ③KDO含量の定量

- 10 KDO含有量をジフェニルアミン法〔アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)、第58巻、第1号、第123～129ページ、1974〕により次のとおり定量した。

- 500mgのジフェニルアミン（和光純薬社製）、5mlのエタノール（和光純薬社製）、45mlの水酢酸（和光純薬社製）、50mlの濃塩酸（和光純薬社製）を混合してKDO検出試薬を調製した。その $500\mu\text{l}$ に、 $0.50\text{mg}/\text{ml}$ の濃度で各試料を含む $250\mu\text{l}$ の水溶液を混合し、 $100^\circ\text{C}$ の沸騰水浴中で30分間加熱し、のち恒温水（ $24\sim 25^\circ\text{C}$ ）中で30分間冷却し、分光光度計（日立製作所製。モデルU2010）により420、470、630、650nmでの吸光度を測定した（測定値を各々A420、A470、A630、A650と記載する）。標準試料として、 $0.5\mu\text{mol}$ の濃度のKDOアンモニウム塩（シグマ社製）水溶液 $250\mu\text{l}$ を使用した。
- 15
- 20

検体試料および標準試料の4種の測定値から、式（1）によりS値を求め、検体試料および標準試料のS値をそれぞれ $S_1$ 、および $S_2$ とした。次いで式（2）によりKDOのモル数Xを算出した。

$$25 \quad S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650} \quad (1)$$

$$X = (0.5 \times S_1 \times \text{LPS 1モルの分子量}) / (0.5 \times S_2 \times 10^6) \dots$$

… (2)

### ④リムラス活性の測定

リムラス活性とは、1968年にレヴィンにより創案されたカプトガニ血球抽



出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステスト（鈴木郁生編、「医薬品の開発第14巻、医薬品の品質管理及び試験法」、第227～243ページ、廣川書店、1990年）で陽性を呈することを意味し、このリムラステストはLPS検出法として知られている。標準品として、345 pg/E

5 Uのイー・コリ(E. coli) 0111:B4を用いてトキシカラーシステム（生化学工業社製）を使用して測定した。

#### ⑤タンパク質含量

タンパク質含量を、ローリー法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ (Journal of Biological Chemistry)、第193巻、第65ページ、195

10 1年] により測定した。

#### ⑥核酸含量

核酸含量を、OD (260 nm-300 nm) での測定値 (1 OD = 40  $\mu$ g) から定量した。

#### ⑦純度

15 純度 (%) は、次式により算出した。

$$\text{純度} = \left[ \left( \text{乾燥収量} - (\text{タンパク質含量} + \text{核酸含量}) \right) / \text{乾燥収量} \right] \times 100$$

### 3) 試験結果

#### ①分子量

分子量測定の結果は、第1図に示す通りである。第1図は、SDS-PAGE

20 泳動図であり、図中レーン1は同時に泳動させたタンパク質およびペプチド分子量マーカー [94 kD、67 kD、43 kD、30 kD、20.1 kD、17.2 kD、14.6 kD、14.4 kD、8.24 kD、6.38 kD、2.56 kD (ファルマシア社製)]、レーン2、3および4はLPS (20  $\mu$ g、5  $\mu$ gおよび1.25  $\mu$ g)、レーン5、6、7および8は低分子量LPS (20  $\mu$ g、5  $\mu$ g、1.25  $\mu$ gおよび0.31  $\mu$ g) であり、図の縦軸は、分子量を示す。

25

一般的に糖鎖を有する物質を電気泳動した場合、レーン当たりのサンプル量が過剰の時には染色帯が幅広くなり、見かけの分子量範囲が広がる。第1図のSDS-PAGEではレーン5から8は、同一試料の低分子量LPSの量を変更し

て泳動したものであるが、試料の泳動量が増えるに従い染色帯の幅が広がっている。従って、正確な分子量を調べる目的では、 $1\mu\text{g}$ 程度の量が適当であり、レーン8が相当する。なお、レーン2およびレーン5は、高分子量のLPSの存在を確認するために多量の試料を泳動させたものである。

- 5      低分子量LPSの分子量（レーン8より計算）は、レーン1のサイズマーカーから計算して染色帯の中心値で5 kD、染色帯幅の範囲は3 kDから7 kDであった。また、レーン5では、 $20\mu\text{g}$ の低分子量LPSを泳動させたにもかかわらず、レーン2のように高分子量LPSは全く認められなかった。

10      以上の結果から、この発明の低分子量LPSの分子量は、 $5,000 \pm 2,000$ であり、高分子量が完全に除去されていることが判明した。

②ヘキサミン含量

この発明の低分子量LPSのヘキサミン数は2個/分子量5,000であった。

③KDO含量

- 15      この発明の低分子量LPSに含まれるKDOは2.4個/分子量5,000であった。

④リムラス活性

- 20      この発明の低分子量LPSのリムラス活性は43.5 EU/ngであり、これに対して、参考例1と同様の方法で調製した従来のLPSのリムラス活性は8.4 EU/ngであった。

⑤タンパク質含量

この発明の低分子量LPSのタンパク質含量は、0.68%以下であった。

⑥核酸含量

この発明の低分子量LPSの核酸含量は0.50%以下であった。

- 25      ⑦純度

この発明の低分子量LPSの純度は98%以上であった。

なお、微生物および製造法を変更して試験したが、ほぼ同様の結果が得られた。

試験例2

この試験は、この発明の低分子量LPSの急性毒性を調べるために行った。

## (1) 試料の調製および試験方法

実施例 1 と同一の方法で調製した低分子量 L P S および参考例 1 と同一の方法で調製した L P S の毒性を、7 週齢の C 3 H / H e マウス（日本チャールス・リバー社から購入）を用いて試験した。1 群 4 匹からなるマウス群に、各試料を生理食塩水に溶解し、1 匹あたり 5. 0、1 0、2 0 および 4 0 m g / k g の割合で静脈内に投与した（ただし 4 0 m g / k g の投与は低分子量 L P S のみ）。投与後 7 2 時間マウスの生死を観察した。

## (2) 試験結果

この試験の結果は表 1 に示すとおりである。表 1 から明らかなように、静脈内投与の場合、この発明の低分子量 L P S ではいずれの投与量においてもマウスの死亡例は認められず、L D<sub>50</sub> は 4 0 m g / k g 以上であったが、L P S では 1 0 および 2 0 m g / k g の投与量で全数が死亡し、L D<sub>50</sub> は 7. 1 m g / k g であった。なお、微生物の種類および低分子量 L P S の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

表 1

試料	静脈内投与			
	投与量 (m g / k g)	死亡数	死亡率 (%)	L D <sub>50</sub> (m g / k g)
L P S	5 1 0 2 0	0 / 4 4 / 4 4 / 4	0 1 0 0 1 0 0	7. 1 (6. 0 - 8. 6)
低分子量 L P S	5 1 0 2 0 4 0	0 / 4 0 / 4 0 / 4 0 / 4	0 0 0 0	> 4 0

## 試験例 3

この試験は、この発明の低分子量 L P S を試験例 2 よりも多量に投与した場合の急性毒性を調べるために行った。

## (1) 試料の調製および試験方法

試験例 2 と同一の低分子量 L P S を 1 匹あたり 4 0、8 0 および 1 6 0 m g / k g の割合で静脈内に投与したこと、および L P S を 1 匹あたり 5. 0、または

10 mg/kg の割合で静脈内に投与したことを除き、試験例 2 と同一の方法により試験した。

## (2) 試験結果

この試験の結果は、表 2 に示すとおりである。表 2 から明らかなように、LPS 5.0 mg/kg の投与量で 25% が、また 10 mg/kg の投与量では 75% が死亡した。これに対して、低分子量 LPS においては 40 mg/kg の投与量で死亡せず、80 および 160 mg/kg の投与量では、100% が死亡した。

前試験例 2 とこの試験例 3 の結果から、LD<sub>50</sub> を算出すると表 3 のとおりである。表 3 から明らかなように、低分子量 LPS の LD<sub>50</sub> の値は LPS のそれに比べて、静脈内投与では約 8 倍であった。

これらの結果は、LPS の分子量の相違が毒性に影響を及ぼすことを示しており、低分子量 LPS は、従来の LPS に比して極めて毒性の低いことが判明した。

表 2

試料	静脈内投与			
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率 (%)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
LPS	5 10	1/4 3/4	25 75	7 (2.5 - 20)
低分子量 LPS	40 80 160	0/4 4/4 4/4	0 100 100	57 (47 - 68)

表 3

試料	毒性 (LD <sub>50</sub> ) (mg/kg)
	静脈内投与
LPS	7.1 (6.8 - 8.6) 7.0 (2.5 - 20)
低分子量 LPS	57 (47 - 68)

## 試験例 4

この試験は、この発明の低分子量 LPS の TNF 産生効果を確認するために行った。

各群 3 匹の 7 週齢の雄 C 3 H / H e マウス (日本チャールズ・リバー社より購入) の尾静脈に、1 匹あたり 0. 1、1. 0、または 10  $\mu$ g の実施例 1 と同様の方法で製造した低分子量 L P S、または参考例 1 と同じ方法で得られた L P S を含む生理食塩水 0. 2 ml を注射し、その 1 時間後に採血し常法により血清を

5 分離した。

このようにして得られた各血清中の T N F 活性を、L 9 2 9 細胞に対する毒性に基づく方法で測定した。すなわち、L 9 2 9 細胞を 5 % ウシ胎児血清を含有する MEM 培地で  $8 \times 10^4$  個 / 100  $\mu$ l の濃度に調製し、これを 96 穴平底プレート

10 の各穴に 100  $\mu$ l づつまき、37℃で 2 時間、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。その後アクチノマイシン D を 1  $\mu$ l / ml となるように添加し、MEM 培地で段階希釈した血清試料または陽性対照ヒト T N F -  $\alpha$  (旭化成社製) を 50  $\mu$ l づつ添加し、更に同じ条件で 18 時間培養した。培地をアスピレーターで取り除いた後、37℃の P B S で洗浄し死細胞を完全に取り除き、0. 1 % クリスタルバイオレットを含む 1 % メチルアルコール溶液を加えて生細胞を染色した。

15 この染色度を O D (590 nm) での吸光度を指標として測定し、陽性対照として用いた T N F -  $\alpha$  の希釈率と吸光度との関係をもとに T N F 活性を算定した。

その結果は、表 4 に示すとおりであった。表 4 において T N F 活性は各群 3 匹の平均値である。この結果から、この発明の低分子量 L P S の T N F 産生効果は、参考例 1 の方法で得られる従来の L P S のそれを上回ることが明らかとなった。

表 4

試 料	L P S 量 ( $\mu$ g / 匹)	T N F 活性 (単位 / ml)
L P S	0. 1 1. 0 10	0. 5 2. 1 15. 2
低分子量 L P S	0. 1 1. 0 10	4. 5 13. 2 28. 3

## 参考例 1

トリプトン (ディフコ社製) 10 g、酵母エキス (ディフコ社製) 5 g、Na

- C1（和光純薬工業社製。特級）10 gを蒸留水1リットルに添加し、NaOHでpHを7.5に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース（和光純薬工業社製。特級）を0.1%の割合で添加した培地（以下L-肉汁培地と記載する）100 mlの入った500 ml容の坂口フラスコに、-80℃で保存されているパントエア・アグロメランス(*Pantoea agglomerans*) 保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,000 mlのL-肉汁培地の入った3リットル容の坂口フラスコに接種し、同様に培養した。
- さらに、7リットルのL-肉汁培地の入った10リットル容の卓上型フーマンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約70 gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。
- 凍結保存菌体約70 gを500 mlの蒸留水に懸濁し、500 mlの90%熱フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000 G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層を更に1回前記と同一の操作を反復し、回収した2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置（アドヴァンテック・トーヨー社製。UK-200）を用いて分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。
- 得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファローズ・ファースト・フロー）にかけ、10 mM トリス-HCl（pH 7.5）および10 mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400 mM NaCl / 10 mM トリス-HCl（pH 7.5）でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約70 gの湿菌体から約300 mgの精製LPSを得た。

#### 図面の簡単な説明

第1図および第2図は各LPS試料のSDS-PAGE図である。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

#### 実施例 1

- 5 参考例 1 と同様の方法で得た精製 LPS 100 mg を 5 mg/ml の濃度で可溶化緩衝液 [3% デオキシコール酸ナトリウム (和光純薬社製)、0.2 M 塩化ナトリウム、5 mM EDTA-2Na および 20 mM トリス-塩酸からなり、pH 8.3] に溶解し、精製 LPS 溶液 20 ml をセファクリル S-200 HR カラム (ファルマシア社製) の上部に静かに重層し、溶出緩衝液 [0.25% デオキシコール酸ナトリウム (和光純薬社製)、0.2 M 塩化ナトリウム、5 mM EDTA および 10 mM トリス-塩酸からなり、pH 8.3] により流速 16 ml/時で 800 ml (50 時間) 溶出した。

- ベリスタポンプ PI (ファルマシア社製) を用いて流速を制御しながら、得られた溶出液を、フラクションコレクター (アドバンテック社製。SF2120) により分画し、最初の 240 ml (24 フラクション分) を廃棄し、その後 10 ml/フラクションで 80 フラクションまで分画した。溶出した各画分について原液または希釈液でフェノール/硫酸法 (福井作蔵、「還元糖の定量法・第 2 版」、第 50~52 ページ、学会出版センター、1990 年) により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPS の存在が予想される分画 (フラクション 30~60) のうち、フラクション 37~55 の各フラクション 0.5 ml を用いて SDS-PAGE を行い、LPS の分画パターンを調べた。

- その結果、フラクション 45-55 は、低分子量 (分子量約 5 kD) LPS のみが認められ、フラクション 37-44 は高分子量および低分子量の両方の LPS が認められたので、フラクション 45-55 の低分子量 LPS 分画を次のとおりさらに精製した。

各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸を除去し、低分子量 LPS を不溶性画分に回収した。低分子量 LPS 画分のエタノール処理をさらに 2 回反復し、デオキシコール酸を除去し、次に 70% エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、

この操作をさらに3回反復し、低分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した低分子量LPSを約20mg得た。

## 実施例2

トリプトン（ディフコ社製）5g、リン酸二水素カリウム1.6gおよび塩化  
5 ナトリウム8gを精製水1,000mlに溶解し、121℃で15分間滅菌した  
（以下これを基礎培地という）。基礎培地100mlに40%塩化マグネシウム  
溶液10mlおよび0.4%マラカイトグリーン溶液3mlを無菌的に添加し、こ  
れをマグネシウム-マラカイトグリーン培地とした。

マグネシウム-マラカイトグリーン培地100mlの入った500ml容の坂口  
10 フラスコに、サルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)保存菌株から単一コ  
ロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,00  
0mlのマグネシウム-マラカイトグリーン培地の入った3リットル容の坂口フラ  
スコに接種し、同一条件で培養した。

さらに、7リットルのマグネシウム-マラカイトグリーン培地の入った10リッ  
15 トル容の卓上型ファーメンター（丸菱バイオエンジニアリング社製）に培養した菌体を接種  
し、同一条件で通気培養し、のち集菌し、約50gの湿菌体を回収し、これを凍  
結保存した。

凍結保存菌体約50gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱  
フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、  
20 4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層をさらに1回前記と  
同一の操作で処理した。2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、  
透析内液を限外濾過装置（アドヴァンテック・トーヨー社。UK-200）を用  
いて分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮をし  
た。

25 得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を  
添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファロー  
ス・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl（pH7.5）およ  
び10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~40  
0mM NaCl/10mMトリス-HCl（pH7.5）でリムラス活性画分



を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約50gの湿菌体から約210mgの精製LPSを得た。

この精製LPS80mgを実施例1と同一の方法で、3%デオキシコール酸ナトリウムを含有する可溶化緩衝液に溶解し、セファクリルS-200HRカラム  
5 (ファルマシア社製)で展開し、低分子量LPSのみを含有する画分を回収し、凍結乾燥後、エタノールに懸濁し、遠心分離によりデオキシコール酸等の緩衝液成分を除去し、凍結乾燥し、約5mgの低分子量LPSを得た。

この低分子量LPSの分子量、KDO数およびヘキソサミン数を前記試験例1と同一の方法で測定した結果、それぞれ6,000、2.01個/分子量6,0  
10 00、および2.8個/分子量6,000であった。

なお、参考のため図2に、サルモネラ・ミネソタ菌株から精製された低分子量LPSのSDS-PAGE図を示す。図中レーン1はタンパク質およびペプチド  
15 マーカー[94kD、67kD、43kD、30kD、20.1kD、17.2kD、14.6kD、14.4kD、8.24kD、6.38kDおよび2.56kD(ファルマシア社製)]、レーン2、3および4はデオキシコール酸ナトリウム存在下でのゲル濾過前の精製LPS(20μg、5μgおよび1.25μg)、レーン5、6、7および8は低分子量LPS(20μg、5μg、1.25μgおよび0.31μg)である。

以下は、本発明の低分子量LPSを含む製剤の処方例である。なお、処方例1  
20 ~4における低分子量LPS量は、リムラステストによる低分子量LPS換算量である。

#### 処方例1(錠剤)

実施例1で得られた低分子量LPS	0.04g
6%HPC乳糖	178g
25 ステアリン酸タルク	8g
バレイショデンプン	14g

以上を混和し、常法に従い打錠して、低分子量LPSを含む0.5gの錠剤を調製した。

#### 処方例2(内用液剤)

実施例 1 で得られた低分子量 L P S 1 m g

精製水 1 0 0 m l

上記配合割合で常法に従い液剤を調製した。

#### 処方例 3 (軟膏剤)

5 実施例 1 で得られた低分子量 L P S 0 . 1 g

精製ラノリン 8 0 g

黄色ワセリン 適量

1 0 0 0 g

上記配合割合で常法に従い軟膏剤を調製した。

#### 10 処方例 4 (注射剤)

実施例 2 で得られた低分子量 L P S 0 . 5 m g

注射用蒸留水 適量

1 0 0 0 m l

上記配合割合で常法に従い注射剤を調製した。

15

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明により、医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い低分子量 L P S が提供される。

20

25

## 請 求 の 範 囲

1. 微生物菌体から得られ、次のa)～c)の理化学的性質

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5, 0  
5 0 0 ± 2, 0 0 0 であり、他に染色帯を実質的に認めないこと  
b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1～3個/分子量  
5, 0 0 0 であること  
c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含  
量が1～3個/分子量5, 0 0 0 であること

10 を有する低分子量リボポリサッカライド。

2. 微生物菌体から得られ、次のa)～f)の理化学的および生物学的性質

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5, 0  
0 0 ± 2, 0 0 0 であり、他に染色帯を実質的に認めないこと  
b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1～3個/分子量  
15 5, 0 0 0 であること  
c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含  
量が1～3個/分子量5, 0 0 0 であること  
d) リムラス活性が、少なくとも10 EU/ng であること  
e) タンパク質含量が、1% (重量) 以下であること

20 f) 核酸含量が、1% (重量) 以下であること

を有する低分子量リボポリサッカライド。

3. 微生物が、グラム陰性微生物である請求の範囲第1項または第2項に記載  
の低分子量リボポリサッカライド。

4. グラム陰性微生物が、パントエア(Pantoea) 属に属する微生物またはサル  
25 モネラ(Salmonella)属に属する微生物である請求の範囲第3項に記載の低分子量  
リボポリサッカライド。

5. 請求の範囲第1～4項の何れか1項に記載の低分子量リボポリサッカライ  
ドと薬学的担体とを含有することを特徴とする医薬組成物。

6. 請求の範囲第1～4項の何れか1項に記載の低分子量リボポリサッカライ

ドを有効成分とする医薬。

7. 免疫賦活剤である請求の範囲第 6 項に記載の医薬。

8. 請求の範囲第 1 ～ 4 項の何れか 1 項に記載の低分子量リポポリサッカライドの医薬としての使用。

5      9. 微生物菌体から抽出して得られた粗リポポリサッカライドを陰イオン交換クロマトグラフィーで処理し、次いでこの処理したものを界面活性剤の存在下にゲル濾過することを特徴とする請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載のリポポリサッカライドの製造方法。

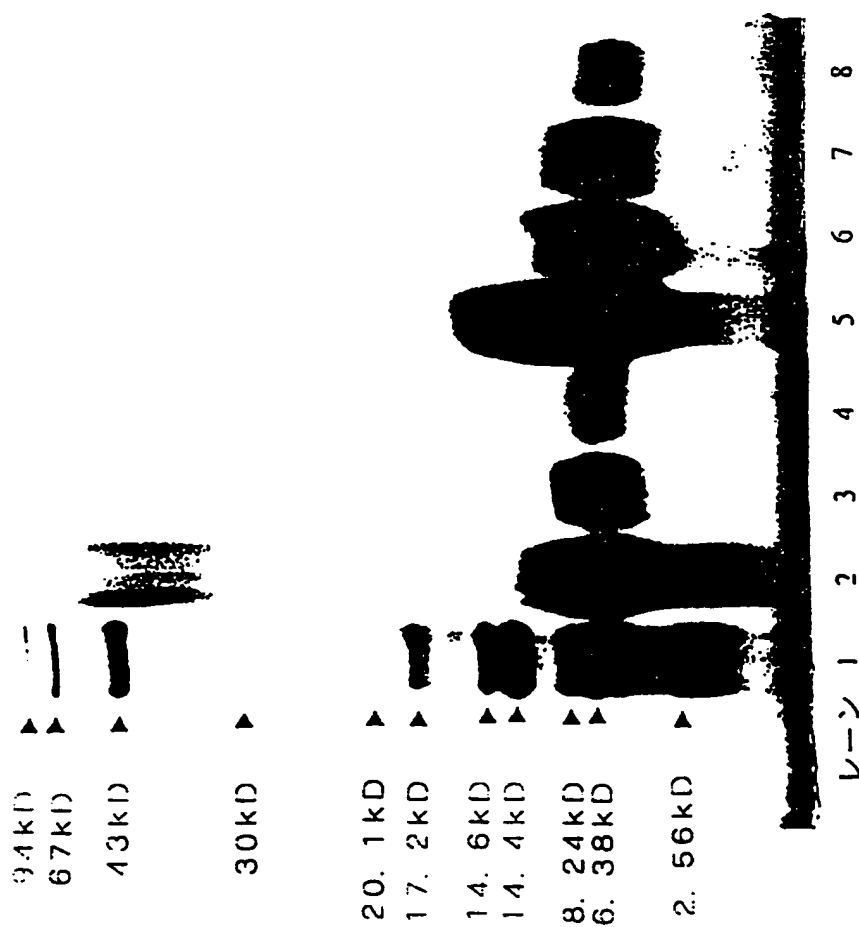
10      10. 界面活性剤がデオキシコール酸であることを特徴とする請求の範囲第 9 項に記載のリポポリサッカライドの製造方法。

15

20

25

# 第 1 図



第 2 図

